基础研究

血小板源性生长因子-BB对大鼠阴茎海绵体平滑肌细胞增殖、迁移及表型转化的影响

陈逢志，何书华，单海涛，张海波，梁雁冰，韦安阳
南方医科大学南方医院惠侨楼一病区，广东 广州 510515

摘要：目的 了解血小板源性生长因子-BB（PDGFBBB）对大鼠阴茎海绵体平滑肌（CCSM）细胞增殖、迁移及表型转化的影响并初步探讨其作用机制。**方法** 采用改良的组织块培养法培养Wistar大鼠CCSM细胞，并用细胞免疫荧光法鉴定。利用CCK-8法检测不同浓度的PDGFBB对培养的大鼠CCSM细胞增殖的影响，并筛选出最适PDGFBB作用浓度。分别用0 ng/mL PDGFBB与最适浓度PDGFBB处理CCSM细胞，利用划痕实验检测PDGFBB对CCSM细胞迁移的影响，24 h和48 h时利用qRT-PCR检测细胞中转录因子myocardin及收缩型表型标志物α-SMA、SMMHC mRNA表达水平；用最适浓度PDGFBB处理CCSM细胞0、24和48 h后，利用western blotting检测细胞中myocardin的蛋白表达水平。**结果** 原代培养的CCSM细胞中α-SMA和smoothelin阳性率分别约为96.5%和96%；不同浓度的PDGFBB均能明显促进CCSM细胞增殖，其最适浓度为12.5 ng/mL。PDGFBB（12.5 ng/mL）能促进CCSM细胞迁移，下调CCSM细胞中myocardin、α-SMA和SMMHC mRNA表达水平（P均<0.01）；在48 h内myocardin蛋白质的表达水平随着PDGFBB作用时间增加而降低。**结论** 改良的组织块培养法可获得高纯的CCSM细胞；PDGFBB可促进CCSM细胞增殖、迁移，使细胞从收缩型向合成型转化，其机制可能是通过下调myocardin。

关键词：血小板源性生长因子-BB；阴茎海绵体平滑肌细胞；表型转化

Effect of platelet-derived growth factor-BB on rat corpus cavernosum smooth muscle cell proliferation, migration and phenotypic modulation

CHEN Fengzhi, HE Shuhua, SHAN Haitao, ZHANG Haibo, LIAN Yanbing, WEI Anyang
Huiqiao Department, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: objective To study the effect of platelet-derived growth factor-BB (PDGFBBB) on rat corpus cavernosum smooth muscle (CCSM) cell proliferation, migration and phenotypic modulation and explore the underlying mechanisms. **Methods** Wistar rat CCSM cells were obtained through a modified tissue culture method and identified by immunofluorescence assay. The effect of PDGFBB on the proliferation of CCSM cells was investigated using a CCK-8 kit and the optimum PDGFBB concentration for cell treatment was determined. CCSM cells were treated with vehicle or PDGF-BB at the optimum concentration, and the cell migration was examined using scratch assay; the mRNA expression of the transcription factor myocardin and the contractile phenotype markers α-SMA and SMMHC in CCSM cells were determined by qRT-PCR at 24 h and 48 h. The protein expression of myocardin in CCSM cells incubated with PDGFBB for 0, 24 and 48 h was examined by Western blotting. **Result** In CCSM cell culture, 96.5% and 96% of the cells were positive for α-SMA and smoothelin, respectively. PDGFBB at different concentrations markedly promoted the proliferation of CCSM cells; the optimum PDGFBB concentration for enhancing cell proliferation was 12.5 ng/mL, which induced the migration of CCSM cells and significantly reduced the mRNA expressions of myocardin, α-SMA and SMMHC (P<0.01). Exposure to PDGFBB decreased the protein expression of myocardin as the exposure time extended (within 48 h). **Conclusion** CCSM cells of a high purity can be obtained by the modified tissue culture method. PDGFBB can promote the proliferation and migration of CCSM cells and cause a phenotypic conversion from the contractile to the synthetic type possibly by down-regulating myocardin.

Key words: platelet-derived growth factor-BB; corpus cavernosum smooth muscle cells; phenotypic modulation

血小板源性生长因子（platelet-derived growth factor, PDGF）是体内一种主要的促有丝分裂剂，可以刺激多种组织细胞增殖、迁移。PDGFBB属于PDGF家族，可由内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞、某些肿瘤细胞等多种细胞分泌，在PDGF家族成员中，仅PDGFBB能结合所有PDGF受体，使受体磷酸化，活化下游重要的信号分子，参与多种信号转导通路如Ras, PI3K, ERK, MAPK等[1]，在动脉粥样硬化、血管再狭窄等心血管疾病的发生发展过程中起非常重要的作用。而平滑肌细胞表型转化这一概念最初在对血管平滑肌细胞（VSMC）的研究中提出来[2]，VSMC分为收缩型（分化型）和合成型（增殖型或去分化型）两种类型，当血管受

收稿日期：2015-01-22
基金项目：国家自然科学基金（81170566）；广东省自然科学基金（S2012010009091）
Supported by National Natural Science Foundation of China(81170566).
作者简介：陈逢志，硕士研究生，E-mail: medboy2012@163.com
通信作者：韦安阳，博士，教授，主任医师，博士生导师，电话：020-61642240，E-mail: profway@126.com

到病理损伤或体外培养的VSMC受到某种因素刺激时,VSMC可从收缩型转化为合成型并获得增殖能力,这个形态、结构和功能的改变过程即称为表型转化[3]。我们前期研究[4]表明,糖尿病性ED大鼠阴茎海绵体平滑肌(CCSM)细胞存在表型转化,CCSM细胞表型转化可以改变阴茎海绵体的正常结构和功能,与ED的发生密切相关。虽然有文献[5-6]报道PDGFBB可促进VSMC增殖、迁移及表型转化,但是在CCSM细胞表型转化和ED方面的研究尚未见报道,它是否会影响CCSM细胞增殖、迁移及表型转化还不清楚。因此本文研究PDGFBB对体外培养的CCSM细胞增殖、迁移及表型转化的影响,并初步研究其作用机制,目的在于探讨CCSM细胞型转化的调控机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

SPF级Wistar大鼠15只(广州南方医科大学实验动物中心提供。许可证号:SCXK(粤)2011-0015)雄性,体质量200 g左右,DMEM/F12培养液(Hyclone公司),胎牛血清(BI公司),0.25%胰蛋白酶消化液(Hyclone公司),抗生素混合液(Sigma公司),重组PDGFBB(preprotech公司),CCK-8(日本同仁化学研究所),TRIzol、逆转录试剂盒及SYBR Premix Ex Taq(TaKaRa公司),FITC标记的羊抗小鼠荧光二抗(碧云天),Alexa Fluor® 555-标记的羊抗小鼠荧光二抗(abcam公司),myocardin一抗(Santa公司),α-SMA一抗(Santa公司),smoothelin一抗(abcam公司),β-actin单克隆抗体(北京锐抗生物公司)。

1.2 大鼠CCSM细胞的分离培养及鉴定

1.2.1 CCSM细胞分离培养 采用我们已经报道的改良的组织块培养法[7]培养大鼠CCSM细胞,大鼠麻醉后在无菌条件下快速解剖,分离、切取阴茎海绵体中段,立即置入含1%青霉素及链霉素的无菌PBS液中并移入超净台,仔细剥除海绵体外周纤维脂肪层及尿道海绵体等,用无菌PBS液冲洗2~3次,将海绵体组织剪成1~2 mm小块,按0.5 cm间隔放置到25 cm^2培养瓶内(预铺少量含20%血清的培养液)。翻转培养瓶,使有组织小块的一面向上,加入2.5 mL配制好的DMEM/F12完全培养液(含20%胎牛血清,100 U/mL青毒素,100 U/mL链霉素),注意勿使培养液与组织块接触。放入37 ℃、5% CO_2细胞培养箱,培养4~5 h后,轻轻翻转培养瓶,使培养液与组织块接触。3~5 d后,置于倒置显微镜下观察,当发现有少许细胞从组织块边缘游出,第2天即清除组织块,补加培养液至4 mL。此后2~3 d换液1次。原代细胞培养至80%~90%融合时,用10% DMEM/F12完全培养液传代培养并用差速贴壁法分离出较纯的CCSM细胞转移至新瓶中,置入培养箱中继续培养。

1.2.2 细胞免疫荧光鉴定 传代细胞以每孔1×10^4个细胞密度接种到预置无菌盖玻片的24孔板中,补充培养液至1 mL,适应性生长24 h,待盖玻片上细胞密度合适,即去除培养液,用PBS液漂洗2次,4%多聚甲醛固定20 min,PBS漂洗3次,每次5 min;予0.25% Triton X-100穿孔15 min,PBS漂洗3次,每次5 min;再用1% BSA(胎牛血清白蛋白)封闭50 min,吸净液体;分别加入1% BSA稀释的α-SMA一抗(1∶100稀释)和smoothelin一抗(1∶100稀释),振荡两次,4 ℃恒温孵育过夜;用PBS漂洗4次,每次5~10 min,避光分别加入1%BSA稀释的FITC标记的羊抗小鼠荧光二抗(1∶100稀释)和Alexa Fluor® 555-标记的羊抗小鼠荧光二抗(1∶100稀释),振荡2次,37 ℃恒温孵育30 min,PBS漂洗4次,每次5~10 min;用DAPI进行细胞核染色3~5 min,吸去DAPI液,用PBS液漂洗3次,每次5 min;予抗荧光衰减封片剂封片后,将载玻片和盖玻片放置于荧光倒置显微镜下拍照。

1.3 细胞增殖实验

传代细胞以每孔3×10^3个细胞密度接种到96孔板中,每孔加细胞悬液200 μL,适应性生长24 h,弃培养液,用PBS液漂洗1次。预设置5个浓度组,每组6个复孔,分别加入PDGFBB终浓度分别为0、2.5、5.0、12.5、25.0 ng/mL的无血清DMEM/F12培养液(0.1%BSA)200 μL,将细胞放置于37 ℃、5% CO_2培养箱继续培养,24 h和48 h后,每孔分别加入20 μL的CCK-8,继续培养2 h后,在多功能酶标仪中450 nm波长下检测各孔光吸收值,并筛选出最适PDGFBB作用浓度,用于后续实验。

1.4 细胞迁移实验

传代细胞按每孔5×10^5密度接种到6孔板中,每孔补充培养液至2 mL,置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养,直到细胞融合至基本铺满整个孔,换无血清DMEM/F12培养液(0.1% BSA)继续培养24 h使细胞同步化,用200 μL的枪头在培养孔中直线刮除细胞,再用PBS漂洗3次,用筛选出的最适PDGFBB浓度(12.5 ng/mL)的无血清DMEM/F12培养液(0.1% BSA)处理细胞,阴性对照组加0 ng/mL的PDGFBB的无血清DMEM/F12培养液(0.1% BSA)。分别于0、12和24 h在倒置显微镜下观察细胞迁移并拍照。

1.5 荧光定量PCR检测CCSM细胞中转录因子myocardin和表型标志物α-SMA、SMMHC的mRNA表达水平

为了了解PDGFBB对大鼠CCSM细胞表型的影响,用终浓度为12.5 ng/mL的PDGFBB(实验组)和0 ng/mL的PDGFBB无血清DMEM/F12培养液(0.1% BSA)(阴性对照组)分别处理CCSM细胞24 h和48 h,

收集各组细胞，使用TRIzol提取总RNA，以各组总RNA为模板，用TaKaRa逆转录试剂盒按照说明书分别合成cDNA，然后以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参(引物均由上海生物工程公司合成，各引物序列见表1)，进行荧光定量PCR，其反应体系为：SYBR Premix Ex Taq(2×)10.0 μL，正向及反向引物(10 mol/L)各0.4 μL，模板cDNA 2.0 μL，ddH_2O补足总体积至20 μL，95℃预变性30 s并按以下PCR反应程序进行40个循环：95 ℃变性5 s，60 ℃退火、延伸30 s，PCR反应后，仪器自动进行熔解曲线分析。每个样品中目的基因相对于空白对照组样品的表达量以$2^{-\Delta\Delta Ct}$(①Ct值代表达到检测荧光阈值的循环数；②△Ct=待测样品目的基因Ct值－待测样品内参的Ct值；③△△Ct=处理后△Ct－处理前△Ct)表示。

表1 引物和序列

Tab.1 Primers and sequences

Primers	Sequences(5'→3')	Segment size/bp
Myocardin	F: CTTGCAGATGACCTCAACGA	91
	R: TCACGGAAGAATCCATAGGC	
α-SMA	F: TTCAATGTCCCTGCCATGTA	94
	R: CATCTCCAGAGTCCAGCACA	
SMMHC	F: GATGTGGTGCAGAAAGCTCA	97
	R: TGAGAATCCATCGGAAAAGG	
GAPDH	F: GCCAGCCTCGTCTCATAGACA	230
	R: AGAGAAGGCAGCCCTGGTAAC	

1.6 Western blotting检测CCSM细胞中myocardin的蛋白表达水平

为了了解PDGFBB作用CCSM细胞不同时间后，细胞中转录因子myocardin蛋白表达变化。予终浓度为12.5 ng/mL的PDGFBB分别处理细胞0、24及48 h后收集三组细胞，用预冷的PBS缓冲液漂洗3次，每皿中加入100 μL RIPA细胞裂解液(加蛋白酶抑制剂)，细胞刮刀收集至无菌EP管中，冰浴裂解30 min后，4 ℃下12 000 *g*离心15 min。取上清液，加入上清液1/4体积的5×上样缓冲液，煮沸5 min，置于冰上冷却。制备10%分离胶和5%浓缩胶，待胶凝固后，每孔上样10~20 μL的蛋白样品进行SDS-PAGE电泳。电泳参数设置：75 V，30 min；120 V，2~3 h，直至溴酚蓝指示线距胶底2 cm处为止。电泳结束后，根据Marker指示条带确定目的蛋白的位置并切胶。转膜夹板制备好后放入转膜槽进行电泳，冰浴中200 mA恒流1.5~2 h。转膜结束后，将PVDF膜用含5%脱脂奶粉的TBST溶液室温封闭1 h，4 ℃于稀释后的一抗中孵育过夜(抗体稀释液比例：myocardin 1∶300，β-actin 1∶8000)。TBST溶液漂洗PVDF膜3次，每次10 min，二抗稀释液室温孵育1 h。TBST溶液漂洗PVDF膜3次，每次10 min，利用采用AlphaEase FC软件对western blotting显色区带的灰度值进行采集与分析，目的蛋白表达量以内参β-actin进行标准化，对比分析各实验组间蛋白表达的差异情况。

1.7 统计学分析

应用SPSS13.0统计软件分析，两组间差异的比较用两个独立样本*t*检验；多样本均数比较采用单因素方差分析，多个实验组和一个对照组的比较采用Dunnett法，组间多重比较采用LSD法。$P<0.05$表示结果有统计学意义。

2 结果

2.1 CCSM细胞的培养和鉴定

2.1.1 CCSM细胞的形态及生长特点 倒置相差显微镜下观察发现，改良组织块法培养大鼠CCSM细胞，原代第4~5 d有少数梭形细胞从组织块边缘游出逐渐形成细胞晕(图1A)，至22 d左右细胞长满覆盖培养瓶底；传代并经差速离心筛选后的细胞绝大部分呈梭形，呈方向性排列，少部分呈星形。生长密集时，梭型或长梭型的细胞相互交织呈网状，密度高时细胞排列呈束状或旋涡状，有时呈"峰-谷"样生长(图1B)。



图1A 原代培养第4天少数梭形细胞从组织块边缘爬出

Fig.1A Cell outgrowth from the edge of tissue blocks on day 4 of primary culture (Phase-contrast microscope, original magnification: ×200).

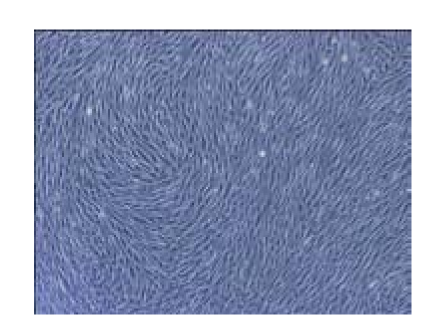


图1B CCSM细胞呈旋涡状或"峰-谷"样生长

Fig.1B Swirling or "peak-valley" like growth pattern of CCSM cells (Phase contrast microscope, original magnification: ×100).

2.1.2 细胞免疫荧光法鉴定 CCSM细胞免疫荧光结果显示(图2),倒置荧光纤维镜下观察发现,视野内所有细胞核均呈现蓝色荧光,绝大多数细胞呈梭形,约96.5%的细胞胞质呈现绿色荧光为α-SMA,约96%细胞胞质呈现红色荧光为smoothelin阳性的细胞,两者均为阳性的细胞阳性的细胞即CCSM细胞。可见改良组织块法加差速贴壁离心法筛选细胞,可得到较纯的CCSM细胞。

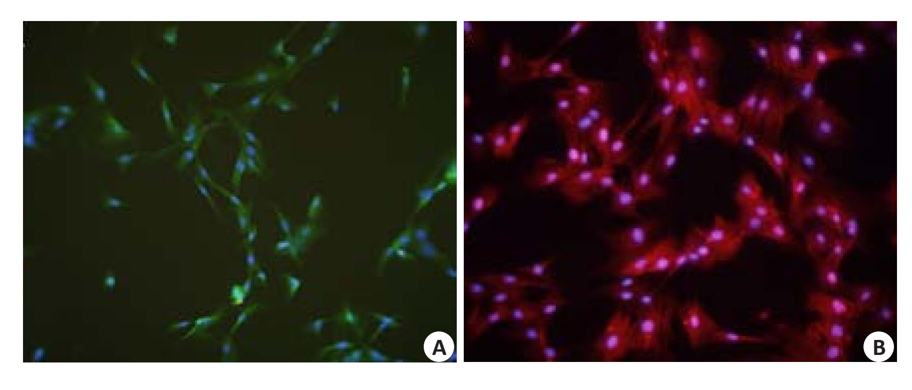


图2 CCSM细胞的免疫荧光鉴定

Fig2 Immunofluorescence identification of CCSM cells for *α*-SMA and smoothelin (Original magnification: × 200). *A*: Immunofluorescence of *α*-SMA protein; *B*: Immunofluorescence of smoothelin protein.

2.2 PDGFBB对CCSM细胞增殖活性的影响

利用CCK-8法,分别采用终浓度为0、2.5、5.0、12.5、25.0 ng/mL的重组PDGFBB作用体外培养的大鼠CCSM细胞,24 h和48 h时用多功能酶标仪读出各孔OD值,结果(图3)显示,在24 h和48 h时,与阴性对照组(0 ng/mL PDGFBB)相比,各不同浓度的PDGFBB均能明显刺激大鼠CCSM细胞生长和增殖(24 h和48 h时*P*值均为$P<0.001$)。且在终浓度为12.5 ng/mL时,PDGFBB对CCSM细胞的促增殖作用最明显;并以此浓度作为PDGFBB作用CCSM细胞的最适浓度来进行后续实验。

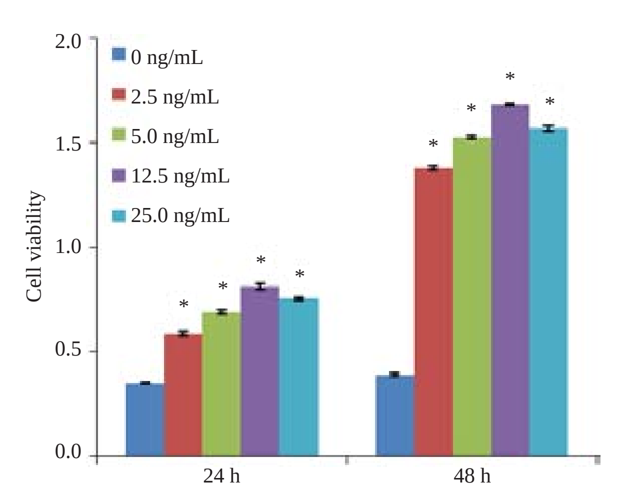


图3 不同浓度的PDGFBB对CCSM细胞增殖活力的影响

Fig.3 Effect of PDGFBB at different concentrations on CCSM cell viability. *$P<0.001$ *vs* control (0 ng/mL PDGFBB).

2.3 PDGFBB对CCSM细胞迁移的影响

利用划痕实验,分别采用0 ng/mL PDGFBB及12.5 ng/mL PDGFBB的无血清DMEM/F12(0.1%BSA)来诱导CCSM细胞迁移,结果(图4)显示,在12 h和24 h,与阴性对照组相比,PDGFBB能明显增强CCSM细胞的迁移能力。

2.4 PDGFBB对CCSM细胞表型转化的影响

根据$2^{-\Delta\Delta Ct}$确定各目的基因的mRNA表达量,与阴性对照组比较,24 h(图5A)和48 h(图5B)时PDGFBB组CCSM细胞中myocardin mRNA表达分别下降45%、66%;α-SMA mRNA表达分别下降28%、50%;SMMHC mRNA表达分别下降44%、58%。可见,PDGFBB能下调CCSM细胞转录因子myocardin及收缩型表型标志物α-SMA、SMMHC及的表达,进而说明PDGFBB可促进CCSM细胞表型转化。根据western blotting检测结果(图6)显示,与0 h相比,PDGFBB刺激CCSM细胞24 h时,细胞中myocardin蛋白表达减少($P<0.001$);与0 h相比,PDGFBB刺激CCSM细胞48 h时,CCSM细胞中myocardin蛋白表达显著减少($P<0.001$);说明在48 h内细胞中myocardin蛋白表达水平随着PDGFBB作用时间延长而逐渐降低。推断myocardin可能参与调控PDGFBB诱导的CCSM细胞表型转化。

3 讨论

在阴茎勃起过程中,CCSM为各种因素作用的终末组织,处于核心地位。CCSM细胞约占海绵体组织40%~52%[8]。CCSM细胞表型转化在器质性ED发生的过程中起非常重要的作用,然而调控CCSM细胞表型转化的机制尚不清楚。

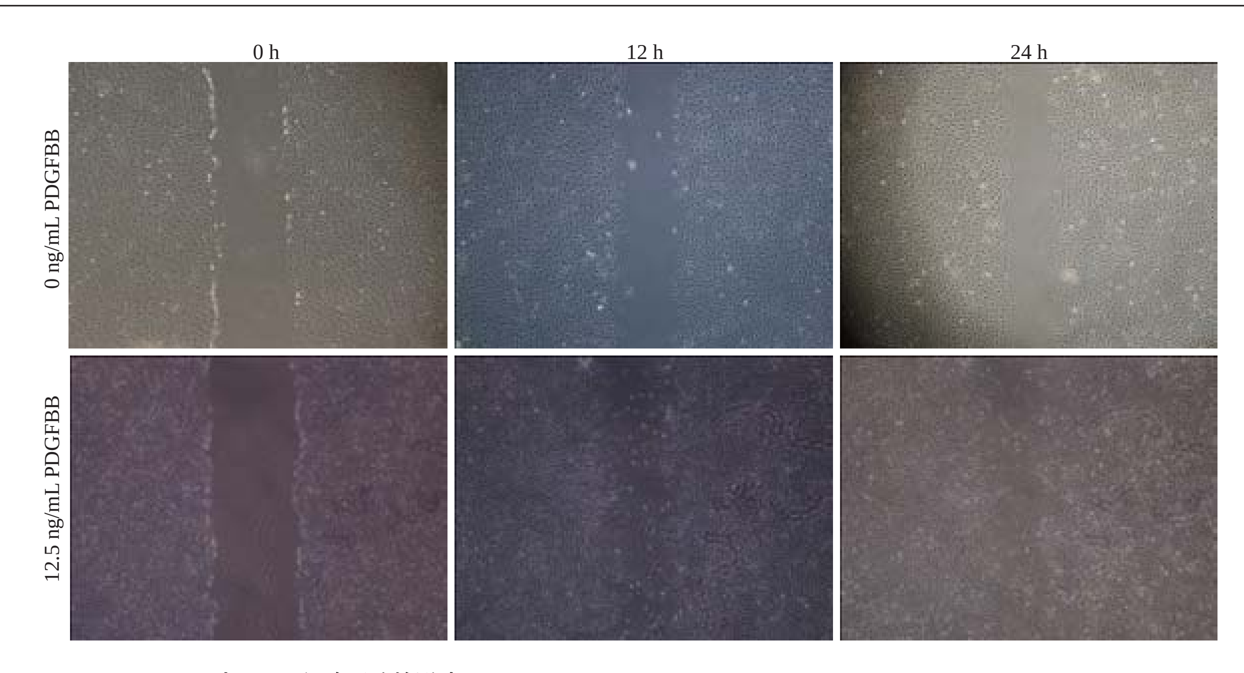
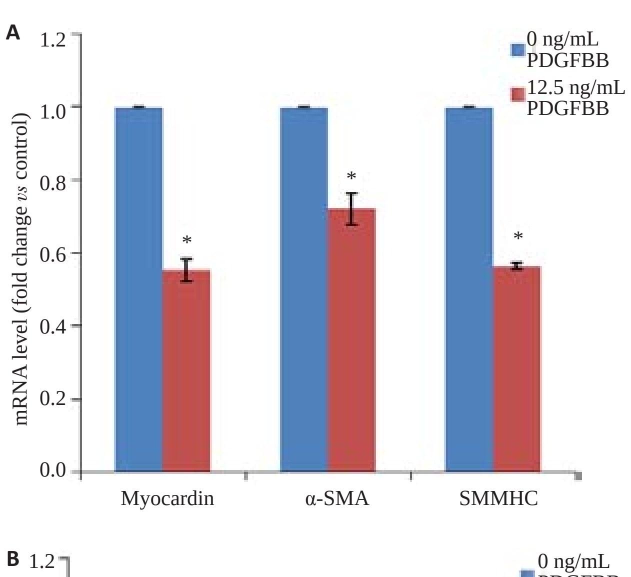


图4 PDGFBB对CCSM细胞迁移的影响

Fig.4 Effect of PDGFBB on CCSM cell migration (Original magnification: ×40).



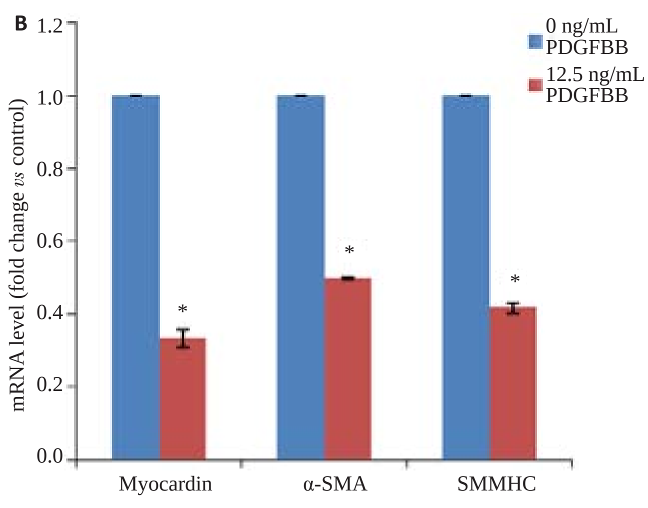


图5 PDGFBB刺激24 h(*A*)和48 h(*B*)时对CCSM细胞表型转化的影响

Fig.5 Effect of PDGFBB on CCSM cell phenotypic modulation at 24 h (*A*) and 48 h (*B*). *P<0.01 *vs* control (0 ng/mL PDGFBB).

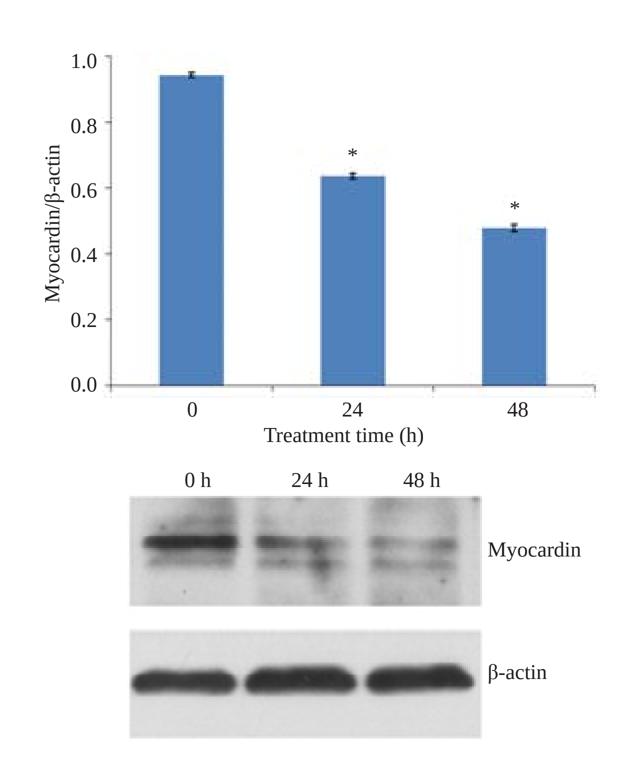


图6 PDGFBB处理不同时间对CCSM细胞中myocardin蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of PDGFBB on myocardin protein expression in CCSM cells at different time points. *P<0.001 *vs* control (0 h).

研究发现PDGFBB能促进VSMC增殖、趋化及使细胞从收缩型向合成型转化[5-6, 9]。然而，PDGFBB是否对类似的CCSM细胞有相似的作用还不清楚。Aversa等[10]研究报道，PDGFBB及PDGF受体可在CCSM细胞中表达，PDGFBB可以改变海绵体组织中平滑肌与纤维结缔组织的比例，导致阴茎海绵体纤维化和ED的发

生。推断PDGFBB可能影响CCSM细胞表型并在器质性ED的发生起重要作用。

本研究首先用不同浓度的重组PDGFBB刺激体外培养的大鼠CCSM细胞,发现各浓度PDGFBB均能明显促进CCSM细胞增殖,并且筛选出PDGFBB作用CCSM细胞的最适浓度为12.5 ng/mL。细胞划痕实验证实,PDGFBB能明显趋化CCSM细胞,增强其迁移能力。虽然PDGFBB能显著促进CCSM细胞增殖、迁移,但是在器质性ED的阴茎病理标本中,未发现CCSM细胞增生,反而有显著减少,这与我们的结果不一致,考虑可能器质性病变时还有其他复杂的机制参与体内CCSM细胞的凋亡,如糖尿病时低氧诱导CCSM细胞凋亡[11]等,因此还需要大量的体内实验进一步探索。然而病理结果发现器质性ED如糖尿病性ED的大鼠CCSM细胞外基质沉积,并出现纤维化[12]。文献报道,VSMC表型转化可调节细胞外基质成分的变化并促进血管纤维化[13]。同样,CCSM细胞表型发生转化,使得其合成细胞外基质的能力增加,促进海绵体纤维化[11],进而导致ED的发生。因此我们主要研究大鼠CCSM表型转化。为此,本实验用重组PDGFBB处理CCSM细胞24 h和48 h后,分别设置阴性对照组,用荧光定量PCR的方法分析CCSM细胞中转录因子myocardin及收缩型表型标志物α-SMA、SMMHC的表达情况,结果发现,在24 h和48 h时PDGFBB均能不同程度地下调CCSM细胞中myocardin、α-SMA和SMMHC的表达。说明PDGFBB可诱导CCSM细胞发生表型转化。另外,我们采用Western blotting检测PDGFBB处理CCSM细胞不同时间后,细胞中myocardin的蛋白表达变化,结果显示,在48 h内myocardin蛋白表达随PDGFBB作用时间延长而下调。Myocardin是平滑肌细胞表型调控过程中重要的调控因子,其与SRF及CArG盒结合形成三元复合物共同调节平滑肌细胞表型[14],并且我们前期研究[15-16]也显示,糖尿病性ED大鼠阴茎海绵体组织中myocardin蛋白表达下调,并且阴茎海绵体过表达myocardin能够逆转CCSM细胞的表型转化和改善糖尿病性ED大鼠的勃起功能。上述结果表明,myocardin可能参与调控PDGFBB诱导的CCSM细胞表型转化。

我们前期对CCSM细胞表型转化尤其是糖尿病性ED的CCSM细胞表型转化方面做了大量研究,然而对其发生表型转化的调控机制研究尚少,本研究结果表明,PDGFBB不仅能促进体外培养的CCSM细胞增殖、迁移,更重要的是,其可诱导CCSM细胞发生表型转化,可能参与糖尿病、呼吸睡眠低通气综合征等器质性ED的发生发展。Myocardin随着PDGFBB作用时间的延长而下调,说明myocardin可能参与调控PDGFBB诱导的CCSM细胞表型转化。然而器质性ED时CCSM细胞发生表型转化是由许多因素共同参与的,其具体分子机制仍不清楚;PDGFBB诱导CCSM细胞表型转化的机制亦非常复杂,涉及许多信号通路,仍需深入研究。

参考文献:

[1] Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15(4): 255-73.

[2] Wissler RW. The arterial medial cell, smooth muscle, or multi-functional mesenchyme?[J]. Circulation,1967, 36(1):1-4.

[3] Rensen SS, Doevendans PA, Van Eys GJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity [J]. Neth Heart J, 2007, 15(3): 100-8.

[4] Wei AY, He SH, Zhao JF, et al. Characterization of corpus cavernosum smooth muscle cell phenotype in diabetic rats with erectile dysfunction[J]. Int J Impot Res, 2012, 24(5): 196-201.

[5] Lee MH, Kwon BJ, Seo HJ, et al. Resveratrol inhibits phenotype modulation by platelet derived growth factor-bb in rat aortic smooth muscle cells[J]. Oxid Med Cell Longev, 2014: 572430.

[6] Gan J, Li P, Wang Z, et al. Rosuvastatin suppresses platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration via the MAPK signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2013, 6(4): 899-903.

[7] 万 波, 韦安阳, 叶挺宇, 等. 改良组织块法培养SD大鼠阴茎海绵体平滑肌细胞[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(3): 494-7.

[8] El-Sakka AI. Yassin a a.amelioration of penile fibrosis:myth or reality[J]. J Androl, 2010, 31(4): 324-35.

[9] Salabei JK, Cummins TD, Singh M, et al. PDGF-mediated autophagy regulates vascular smooth muscle cell phenotype and resistance to oxidative stress[J]. Biochem J, 2013, 451(3): 375-88.

[10] Aversa A, Basciani S, Visca P, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptors in rat corpus cavernosum: changes in expression after transient *in vivo* hypoxia[J]. J Endocrinol, 2001, 170 (2): 395-402.

[11] Lv B, Zhao J, Yang F, et al. Phenotypic transition of corpus cavernosum smooth muscle cells subjected to hypoxia [J]. Cell Tissue Res, 2014, 357(3): 823-33.

[12] Zhou F, Li GY, Gao ZZ, et al. The TGF-β1/Smad/CTGF pathway and corpus cavernosum fibrous-muscular alterations in rats with streptozotocin-induced diabetes[J]. J Androl, 2012, 33(4): 651-9.

[13] Touyz AA. Angiotensin II and vascular injury[J]. Curr Hypertens Rep, 2014, 6(16): 431.

[14] Long X, Bell RD, Gerthoffer WT, et al. Myocardin is sufficient for a smooth muscle-like contractile phenotype[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(8): 1505-10.

[15] He SH, Wei AY, Yang Y, et al. Reduced expression of myocardin and serum response factor in the cavernous tissue of diabetic rats [J]. Andrologia, 2012, 44(Suppl 1): 518-22.

[16] He S, Zhang T, Liu Y, et al. Myocardin restores erectile function in diabetic rats: phenotypic modulation of corpus cavernosum smooth muscle cells[J]. Andrologia, 2015, 47(3): 303-9.

(编辑:吴锦雅)